

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL AKAR, KULIT
BATANG, DAN BIJI JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* Linn)
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**



Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada Fakultas Farmasi

Oleh:

NUR ERVIA RAHMAWATI

K 100 140 054

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2018**

HALAMAN PERSETUJUAN

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL AKAR, KULIT
BATANG, DAN BIJI JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* Linn) TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA T47D**

PUBLIKASI ILMIAH

Oleh:

NUR ERVIA RAHMAWATI

K100140054

Telah diperiksa dan disetujui oleh:

Dosen Pembimbing



Ratna Yuliani, M.Biotech.Sc

NIK. 957

HALAMAN PENGESAHAN

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL AKAR, KULIT
BATANG, DAN BIJI JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* Linn) TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA T47D**

OLEH

Nur Ervia Rahmawati

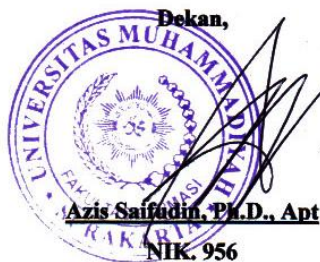
K100140054

**Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari Sabtu, 20 Januari 2018
dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

Dewan Penguji:

- | | |
|---------------------------------------|---------|
| 1. Maryati, Ph.D., Apt Dr. | (.....) |
| (Ketua Dewan Penguji) | |
| 2. Tanti Azizah, M.Sc., Apt | (.....) |
| (Anggota I Dewan Penguji) | |
| 3. Ratna Yuliani, M.Biotech.St | (.....) |
| (Anggota II Dewan Penguji) | |

Dekan,



Azis Saifudin, Ph.D., Apt
NIK. 956


PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 29 Desember 2017

Penulis



NUR ERVIA RAHMAWATI

K 100 140 054

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL AKAR, KULIT BATANG, DAN BIJI
JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* Linn) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA**

Abstrak

Kanker payudara adalah salah satu penyakit mematikan yang dapat menyerang manusia, terutama wanita. Berbagai pengobatan kanker yang sudah diterapkan banyak menimbulkan efek samping merugikan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar terhadap sel kanker payudara T47D serta mengetahui kandungan golongan senyawa dalam akar, kulit batang, dan biji jarak pagar (*Jatropha curcas* Linn). Serbuk akar, kulit batang, dan biji jarak pagar dimaserasi menggunakan etanol 96%. Ekstrak kental yang diperoleh diuji sitotoksitasnya dengan metode MTT assay. Analisis kandungan ekstrak dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika GF254 dan fase gerak untuk akar, kulit batang, dan biji secara berurutan adalah n-butanol:asam asetat:air (4:1:5), n-heksana:etil asetat (7:3), dan n-heksana:kloroform (5:5). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol akar dan kulit batang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} secara berurutan yaitu 265,83 $\mu\text{g/ml}$ dan >1000 $\mu\text{g/ml}$. Hasil analisis kandungan ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar jarak pagar memiliki kandungan kimia berupa alkaloid, saponin, dan fenolik. Kulit batang jarak pagar memiliki kandungan senyawa berupa alkaloid, saponin, terpenoid, fenolik, dan flavonoid. Biji jarak pagar memiliki kandungan senyawa saponin.

Kata Kunci: *Jatropha curcas* Linn, sitotoksik, sel T47D, MTT Assay, KLT

Abstract

Breast cancer is one of the deadly diseases that can affect humans, especially in women. The various cancer treatments can cause side effects. The aim of this study was to investigate the cytotoxic activity of ethanol extract of *Jatropha curcas* root, stem bark, and seeds against T47D breast cancer cells and identify the compounds in each extract. *Jatropha curcas* root, stem bark, and seeds were macerated using 96% ethanol. The viscous extracts obtained were tested their cytotoxicity by using MTT assay method. Thin layer chromatography (TLC) was conducting using silica GF 254 as a stationary phase and the mobile phase for root, bark and seed were n-butanol:acetic acid:water (4:1:5), n-hexane:ethyl acetate (7:3), and n-hexane:chloroform (5:5), respectively. The results showed that ethanol extracts of root and stem bark have cytotoxic activity with IC_{50} value of 265.83 $\mu\text{g/ml}$ and >1000 $\mu\text{g/ml}$, respectively. TLC results showed that ethanol extract of *Jatropha curcas* root contain alkaloid, saponin, and phenolic compound. The compounds that were identified in *Jatropha curcas* bark were alkaloid, saponin, terpenoid, phenolic, and flavonoid. *Jatropha curcas* seeds contain saponin.

Keywords: *Jatropha curcas* Linn, cytotoxic, T47D cell, MTT Assay, TLC

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang biasanya dikenal oleh masyarakat sebagai penyakit mematikan apabila tidak ditangani dengan cepat serta terapi yang tepat (Nussbaum *et al.*, 2001). Berdasarkan data statistik Amerika tahun 2017, ditemukan sebanyak 255.180 kasus baru kanker payudara. Berdasarkan data tersebut, diketahui juga bahwa angka kematian akibat kanker payudara sebanyak 41.070 kematian, yang terdiri dari 40.610 kematian pada wanita dan 460 kematian pada pria (Siegel *et al.*, 2017). Prevalensi penyakit kanker payudara di Indonesia pada tahun 2013 menempati tertinggi kedua setelah kanker serviks, yaitu sebesar 0,5% (Kemenkes RI, 2015). Terapi kanker yang sudah diterapkan banyak menimbulkan efek samping berupa kerusakan ginjal, gonadotoksis, resistensi terhadap pengobatan, kardiotoxsis, neurotoksis, dan dermatoksis (Tjay and Rahardja, 2002).

Ada beberapa penelitian yang menunjukkan jarak pagar mempunyai aktivitas sitotoksik yang dapat digunakan untuk melawan berbagai pertumbuhan kanker, salah satunya kanker payudara. Ekstrak metanol akar jarak pagar (*Jatropha curcas* Linn) memiliki potensi melawan sel kanker kolon HT-29 dengan IC_{50} sebesar $18,3 \pm 0,98 \mu\text{g/ml}$ (Oskoueian *et al.*, 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Sahidin *et al.* (2011) menunjukkan bahwa kurkusion B (golongan terpenoid) yang terkandung dalam kulit batang jarak pagar memiliki potensi melawan sel kanker darah K-562 dengan IC_{50} sebesar $6 \mu\text{g/ml}$ dan sel kanker paru H1299 dengan IC_{50} sebesar $15,0 \mu\text{g/ml}$ (Sahidin *et al.*, 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Oskoueian *et al.* (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *kernel meal* jarak pagar mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} sebesar $27,5 \mu\text{g/ml}$ dan pada sel kanker serviks HeLa dengan IC_{50} sebesar $56,4 \mu\text{g/ml}$. Senyawa forbol ester yang diisolasi dari *Jatropha meal* memiliki potensi melawan sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} sebesar $128,6 \mu\text{g/ml}$ dan sel kanker serviks HeLa dengan IC_{50} sebesar $133,0 \mu\text{g/ml}$ (Oskoueian *et al.*, 2012). Berdasarkan uraian di atas, bagian tanaman jarak pagar (akar, kulit batang, dan biji) memiliki kemungkinan sebagai kandidat melawan sel kanker payudara T47D.

Akar dan lateks jarak pagar mengandung fenolik, flavonoid, dan saponin yang menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan, antikanker, dan antiinflamasi (Oskoueian *et al.*, 2011). Kulit batang jarak pagar mengandung fenolik, asam fitat, inhibitor tripsin, lektin, saponin, dan forbol ester (Oskoueian *et al.*, 2011). Biji jarak pagar mengandung forbol ester (terpenoid) yang menunjukkan aktivitas sebagai agen antikanker (Oskoueian *et al.*, 2011). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil kandungan senyawa dalam akar, kulit batang, dan biji jarak pagar.

2. METODE

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *vacuum rotary evaporator* (Heidolph), *waterbath* (Memmert), *Cytotoxic Safety Cabinet* (ESCO), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) *reader* (Elx800 Bio Tech), mikroskop *inverted*/cahaya (Olympus CKX41), inkubator CO₂ (BINDER), *hemocytometer* (Neubauer), *counter*, lampu UV, *vortex* (Maxi Mix II), sonikator (Branson), tabung mikro, neraca analitik (Ohaus), blender (Cosmos), oven (BINDER), botol Duran, tabung konikal, cawan porselen, rak tabung, pipet Pasteur, mikropipet (Socorex), bejana elusi, dan pipa kapiler.

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar jarak pagar, kulit batang jarak pagar, biji jarak pagar, sel kanker payudara T47D, etanol 96%, *Phosphat Buffered Saline* (PBS), reagen MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide} 5mg/ml PBS (50 mg MTT dan 10 mL PBS), *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% dalam 0,1 N HCL, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, *Trypsin-EDTA* 1x (25%), 96-well plate, media kultur RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*), *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), penisilin-streptomisin 1%, fungizon 0,5%, *yellow tip*, *blue tip*, tabung mikro, silika gel GF254, akuades, heksana, metanol, etil asetat, kloroform, dan aluminium foil.

2.3 Penyiapan Bahan

Masing-masing sampel akar, kulit batang, dan biji jarak pagar dicuci hingga bersih dan diangin-anginkan selama 1 hari. Kemudian dilakukan perajangan bahan tanaman tersebut. Setelah perajangan bahan, dilakukan pengeringan selama ± 7 hari dengan ditutupi kain hitam untuk mempercepat pengeringan dan melindungi dari sinar UV. Simplisia yang telah kering dipisahkan dari pengotor yang masih tertinggal dan dihaluskan untuk memaksimalkan proses maserasinya.

2.4 Ekstraksi

Serbuk akar, kulit batang, dan biji jarak pagar yang telah terkumpul ditimbang masing-masing sebanyak 51,68; 51,22; dan 51,25 gram. Serbuk yang telah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan merendam serbuk akar, kulit batang, dan biji jarak pagar menggunakan etanol 96% (± 50 gram serbuk dengan 500 ml pelarut/perbandingan 1:10 b/v) dan dibiarkan selama 72 jam pada suhu kamar sambil sesekali diaduk. Hasil maserasi tersebut disaring menggunakan corong *buchner* dan kertas saring serta dibantu menggunakan vakum. Selanjutnya ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar

diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ agar terpisah dari pelarutnya serta diletakkan di atas *waterbath* pada suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ agar diperoleh ekstrak kental.

2.5 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT

Sel T47D dimasukkan kedalam *96-well plate* masing-masing 100 μL . Setiap mengisi 12 sumuran, dilakukan resuspensi kembali agar sel tetap homogen dan disisakan sebanyak 3 sumuran kosong. Sel-sel T47D tersebut diamati distribusinya dibawah mikroskop cahaya. Kontrol sel digunakan 100 μL suspensi sel dan ditambahkan ke dalam sumuran yang telah diisi media RPMI 100 μL . Sel diinkubasi selama semalam agar pulih setelah dipanen. Media pada *plate* yang berisi sel T47D dibuang, kemudian ditiriskan dengan menggunakan tisu makan. PBS sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam semua sumuran yang telah diisi sel, kemudian dibuang. *Plate* yang telah terisi sel diberi perlakuan dengan beberapa konsentrasi kadar sampel ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam. Media sel dibuang kembali dan ditambahkan PBS 1x. Reagen MTT sebanyak 100 μL ditambahkan ke dalam setiap sumuran, kemudian diinkubasi selama 2-4 jam hingga terbentuk kristal formazan. Apabila sudah terbentuk formazan dengan jelas (dilihat pada mikroskop cahaya), ditambahkan reagen *stopper* berupa SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Absorbansi masing-masing sumuran dapat dibaca pada panjang gelombang 550-600 nm menggunakan *ELISA reader* (CCRC, 2009).

2.6 Penentuan Kandungan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak kental sebanyak 100 gram ditimbang dan ditambahkan pelarut etanol PA sampai 1 ml, sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 10%. Larutan stok tersebut ditotolkan sebanyak 2 μl ke plat silika gel GF254 dengan jarak pengembangan 8 cm. Kemudian plat yang telah ditotolkan ekstrak akar, kulit batang, dan biji jarak pagar tersebut dielusi dengan fase gerak hasil optimasi. Untuk ekstrak etanol akar, dielusi dengan fase gerak yaitu n-butanol:asam asetat:air dengan perbandingan 4:1:5. Sedangkan untuk ekstrak etanol kulit batang jarak pagar dielusi dengan fase gerak n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 7:3. Elusi ekstrak etanol biji jarak pagar digunakan fase gerak yaitu n-heksana:kloroform dengan perbandingan 5:5. Untuk menganalisis kandungan dalam ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar digunakan reagen penyemprot berupa Dragendorff, FeCl_3 , Sitroborat, Anisaldehyd- H_2SO_4 , dan Liebermann-Burchard (LB). Kandungan yang dianalisis berupa alkaloid, terpenoid, fenolik, flavonoid, dan saponin.

2.7 Analisis Data

2.7.1 Sitotoksik

Teknik analisis data dilakukan dengan mengetahui nilai IC_{50} yang memiliki potensi sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara T47D. Penghitungan IC_{50} sebagai berikut:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (1)$$

Berdasarkan hasil perhitungan dengan rumus diatas, dapat dibuat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup. Dari persamaan regresi linier dapat diperoleh nilai r. Nilai IC_{50} dihitung dari nilai antilog dari konsentrasi tersebut (nilai x) dengan memasukkan $y = 50\%$ pada persamaan regresi linier (CCRC, 2009).

2.7.2 KLT

Teknik analisis data dalam uji KLT dilakukan untuk mengonfirmasi adanya kandungan zat kimia di dalam akar, kulit batang, dan biji jarak pagar. Pengujian KLT dilakukan dengan melakukan penotolan pada silika gel GF254, sehingga diperoleh bercak elusi yang dapat dihitung nilai R_f nya menggunakan rumus Gritter *et al.*, (1991):

$$R_f = \frac{\text{Jarak gerakan zat terlarut (cm)}}{\text{Jarak gerakan pelarut (cm)}} \quad (2)$$

Plat KLT yang telah kering dapat diamati di bawah UV254, UV366, dan sinar tampak. Untuk lebih memperjelas bercak yang timbul, dapat digunakan beberapa reagen semprot:

- 1) Reagen Dragendorff digunakan untuk mendeteksi senyawa alkaloid. Warna yang terbentuk adalah jingga kecoklatan di bawah sinar tampak (Wagner and Bladt, 1996).
- 2) Reagen anisaldehyd-asam sulfat digunakan untuk mendeteksi senyawa terpenoid. Warna yang terbentuk adalah merah-ungu di bawah sinar tampak atau UV366 nm (Wagner and Bladt, 1996).
- 3) Reagen $FeCl_3$ digunakan untuk mendeteksi senyawa fenolik. Warna yang terbentuk adalah abu-abu sampai biru di bawah sinar tampak (Wagner and Bladt, 1996)
- 4) Reagen sitroborat digunakan untuk mendeteksi senyawa flavonoid. Warna yang terbentuk adalah kuning kehijauan di bawah sinar UV366nm (Markham, 1988).
- 5) Reagen Liebermann-Burchard (LB) digunakan untuk mendeteksi senyawa saponin dan diamati di bawah sinar UV366 nm (Wagner and Bladt, 1996). Warna yang terbentuk pada pengamatan senyawa saponin di bawah sinar UV366 nm adalah hijau (Handayani *et al.*, 2008)

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi

Ekstraksi sampel akar, kulit batang, dan biji jarak pagar dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi dipilih sebagai metode ekstraksi karena merupakan metode penyarian yang paling mudah untuk dilakukan serta memiliki hasil rendemen yang tinggi (Saifudin, 2014).

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil rendemen suatu ekstrak. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil rendemen adalah metode ekstraksi yang dipilih. Maserasi merupakan metode yang tepat digunakan untuk senyawa yang tidak tahan terhadap panas (terdegradasi karena panas), tetapi kekurangannya metode ini tidak dapat menyari senyawa tertentu yang kelarutannya rendah terhadap suhu ruang (Sarker *et al.*, 2006).

Jayanudin *et al.* (2014) dan Purwanto *et al.* (2014) memaparkan bahwa suhu, rasio pelarut, dan jenis pelarut juga dapat mempengaruhi tinggi rendahnya rendemen ekstrak. Suhu berpengaruh terhadap terbukanya pori-pori simplisia yang berdampak pada kecepatan masuknya pelarut kedalam simplisia tersebut. Rasio pelarut yang digunakan berpengaruh terhadap kecepatan distribusi pelarut kedalam simplisia (Jayanudin *et al.*, 2014).

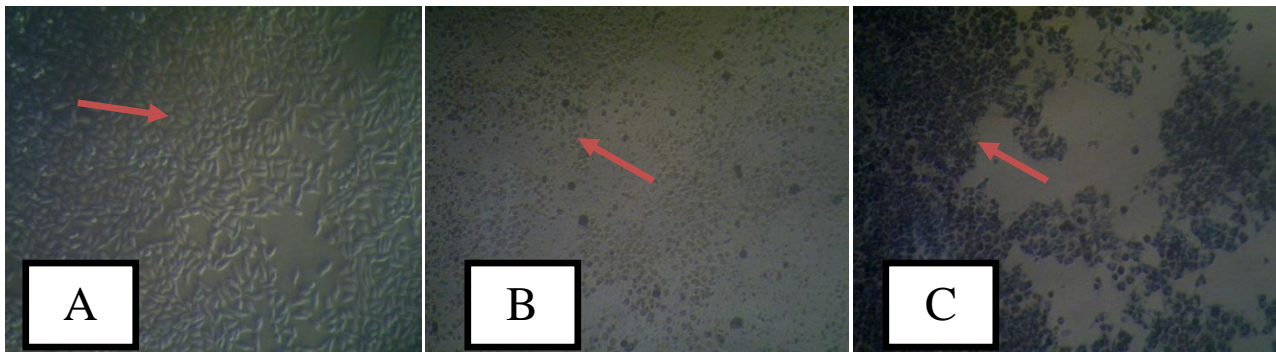
Perhitungan rendemen ekstrak diperoleh dengan membandingkan berat ekstrak kental dengan berat simplisia. Hasil perhitungan ekstrak etanol akar, kulit batang dan biji jarak pagar secara berurutan adalah 4,06%, 1,80%, dan 7,85%. Menurut saifudin (2014) mayoritas metabolit sekunder bersifat semi polar, sehingga larut dalam pelarut organik. Metabolit sekunder yang bersifat polar contohnya adalah glikosida yang mengikat satu atau lebih molekul gula heksosa atau pentosa. Terpenoid termasuk kedalam metabolit sekunder yang bersifat nonpolar sehingga cenderung akan terekstrak pada pelarut nonpolar dan semipolar. Menurut Harborne (1987) saponin dan fenolik bersifat polar. Saponin bersifat polar karena cenderung dalam bentuk glikosida, sedangkan fenolik bersifat polar karena larut dalam air. Alkaloid terekstrak paling efektif dengan pelarut non polar, namun juga dapat diekstrak dengan pelarut semipolar dan polar. Markham (1988) memaparkan bahwa flavonoid bersifat polar karena memiliki ikatan dengan gugus gula.

Etanol 96% digunakan sebagai pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang tinggi sehingga senyawa-senyawa dengan kepolaran yang tinggi akan ikut terekstrak (Purwanto *et al.*, 2014). Oleh karena itu, perbedaan rendemen hasil maserasi akar, kulit batang, dan biji jarak pagar dapat terjadi karena ada golongan senyawa kimia tertentu yang tidak ikut terekstrak selama proses maserasi karena adanya perbedaan sifat kepolaran yang dimilikinya dengan pelarut yang digunakan.

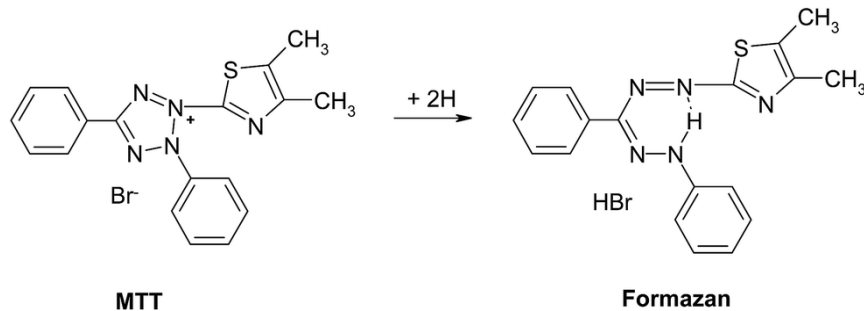
3.2 Uji Sitotoksik

Uji aktivitas sitotoksik yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode MTT *assay*. Prinsip dari metode MTT adalah terbentuknya kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air sebagai hasil dari proses reduksi garam kuning tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase (Gambar 2). Warna ungu kristal formazan yang dihasilkan berasal dari suksinat tetrazolium dan dapat diukur pada ELISA reader dengan panjang

gelombang 550-600 nm. Sebelum diukur intensitas kristal formazan ini, perlu ditambahkan reagen stopper yang bertujuan untuk melarutkan kristal dan menghentikan reaksi tersebut. Intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel kanker yang hidup, dapat dilihat pada Gambar 1C. Oleh karena itu, apabila warna ungu yang terbentuk semakin pekat, sel kanker yang hidup semakin banyak, sedangkan apabila intensitas warna ungu yang terbentuk semakin tidak terlihat maka sel kanker yang hidup semakin sedikit.

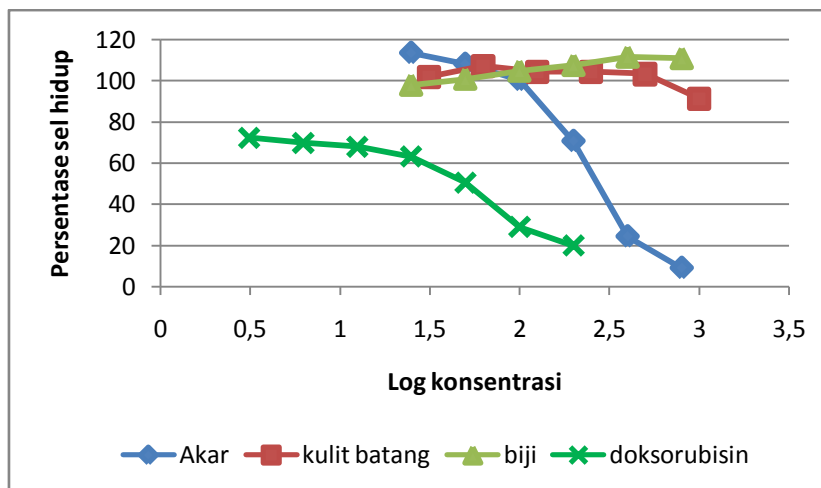


Gambar 1. Morfologi sel kanker T47D. Sebelum diberi perlakuan/sel hidup (A), sesudah diberi perlakuan ekstrak etanol akar jarak pagar dengan konsentrasi 800 µg/ml /sel mati (B), dan kristal formazan yang terbentuk setelah penambahan reagen MTT (C).



Gambar 2. Reaksi reagen MTT membentuk kristal formazan (Aula *et al.*, 2015).

Berdasarkan Gambar 1 di atas terlihat bahwa terdapat perbedaan morfologi antara sel T47D sebelum diberi perlakuan apapun (Gambar 1A) dengan sel T47D setelah diberi perlakuan dengan ekstrak ataupun dengan kontrol positif doksorubisin (Gambar 1B). Sel kanker payudara yang masih hidup atau sebelum diberi perlakuan memiliki bentuk lonjong, menggerombol dan selnya terlihat besar (Gambar 1A). Sel kanker yang telah mati berbentuk bulat, kecil, dan inti selnya berwarna hitam (Gambar 1B).



Gambar 3. Pengaruh perlakuan ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar serta doksorubisin terhadap persentase sel hidup (sel kanker T47D).

Tabel 1. Kategori sitotoksitas menurut United State National Cancer Institute (NCI, 1965).

NO	IC50 (µg/ml)	Keterangan
1.	≤ 20	Sangat toksik
2.	21 < IC50 < 200	Moderat/cukup aktif
3.	201 < IC50 < 500	Lemah
4.	>500	Tidak toksik

Tabel 2. Nilai IC50 ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar serta kontrol positif doksorubisin terhadap sel kanker T47D

No	Keterangan	IC50 (µg/ml)	Keterangan
1.	Ekstrak Etanol Akar	265,83	Lemah
2.	Ekstrak Etanol Kulit Batang	>1000	Tidak toksik
3.	Ekstrak Etanol Biji	-	Tidak toksik
4.	Doksorubisin	32,008	Moderate/cukup aktif

Berdasarkan Gambar 2 menunjukkan bahwa persentase penghambatan pertumbuhan sel kanker yang ditunjukkan paling kecil adalah penghambatan oleh doksorubisin. Hasil IC₅₀ yang diperoleh cukup aktif yaitu sebesar 32,008 µg/ml. Menurut Smith *et al.* (2006) doksorubisin adalah obat yang paling banyak digunakan sebagai terapi kanker, salah satunya adalah kanker payudara. Namun kekurangan dari obat ini adalah adanya resiko resistensi yang ditimbulkan (Minotti *et al.*, 2004). Pada penelitian yang dilakukan oleh Susidarti *et al.* (2014) menunjukkan bahwa doksorubisin memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC₅₀ sebesar 0,02 µg/ml.

Oleh karena itu, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mungkin sel kanker payudara T47D yang digunakan telah mengalami resistensi. Li *et al.* (2005) memaparkan bahwa resistensi sel kanker T47D yang diberi perlakuan dengan doksorubisin dapat meningkatkan suatu protein anti-apoptosis dan dapat menginaktifkan inisiator apoptosis (caspase 9) melalui jalur caspase.

Tingkat ketoksikan menurut National Cancer Institute dibagi menjadi 4 kategori, yaitu sangat toksik, kurang toksik, lemah, dan tidak toksik (Tabel 2). Kategori ini menjadi acuan dalam menentukan tingkat ketoksikan yang dimiliki oleh ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar dalam melawan sel kanker payudara T47D.

Ekstrak etanol akar jarak pagar memiliki kemampuan dalam menghambat sel kanker payudara sampai 50% populasi sel hidup. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak etanol akar sebesar 265,83 $\mu\text{g/ml}$. Hasil ini dikatakan lemah ketoksikannya dalam melawan sel kanker payudara T47D. Nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit batang jarak pagar yang diperoleh sebesar $>1000 \mu\text{g/ml}$ (Tabel 2). Persentase penghambatan sel kanker payudara dari ekstrak etanol kulit batang inipun tidak mencapai 50% dari populasi sel kankernya. Dari hasil ini, ekstrak etanol kulit batang jarak pagar ini dikatakan tidak poten dan tidak dapat digunakan sebagai alternatif dalam pengobatan kanker payudara. Biji jarak pagar juga tidak memiliki aktivitas melawan sel kanker payudara T47D (Tabel 2). Ekstrak etanol biji jarak pagar menunjukkan hasil berupa tingginya konsentrasi ekstrak etanol biji jarak pagar dapat meningkatkan pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Hal ini dapat diperhatikan pada % sel hidup yang meningkat jika konsentrasi ekstrak tersebut ditambah .

Penelitian yang dilakukan oleh Oskoueian *et al.*, (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol akar jarak pagar memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon HT-29 dengan IC_{50} sebesar $18,3 \pm 0,98 \mu\text{g/ml}$. Ekstrak metanol akar jarak pagar tersebut lebih poten dibandingkan kontrol positif yang digunakan (tamoksifen) dengan IC_{50} sebesar $36,2 \pm 2,99 \mu\text{g/ml}$. Kulit batang jarak pagar juga telah diteliti kemampuan hambatan terhadap sel kanker. Sahidin *et al.*, (2011) menyatakan bahwa *curcusone* B (golongan terpenoid) yang terkandung dalam kulit batang jarak pagar memiliki potensi melawan sel kanker darah K-562 dengan IC_{50} sebesar 6 $\mu\text{g/ml}$ dan sel kanker paru H1299 dengan IC_{50} sebesar 15,0 $\mu\text{g/ml}$ (Sahidin *et al.*, 2011). Selain akar dan kulit batang, biji jarak pagar juga telah diteliti sebelumnya menggunakan ekstrak metanol *kernel meal*. Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa ekstrak *kernel meal* mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} sebesar 27,5 $\mu\text{g/ml}$ dan pada sel kanker serviks HeLa dengan IC_{50} sebesar 56,4 $\mu\text{g/ml}$ (Oskoueian *et al.*, (2011). Senyawa forbol ester yang diisolasi dari *Jatropha meal* memiliki potensi melawan sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} sebesar 128,6 $\mu\text{g/ml}$ dan sel kanker

serviks HeLa dengan IC_{50} sebesar 133,0 $\mu\text{g/ml}$ (Oskoueian *et al.*, 2012). Menurut Haas *et al.* (2002) forbol ester merupakan salah satu senyawa yang terkandung dalam biji jarak pagar.

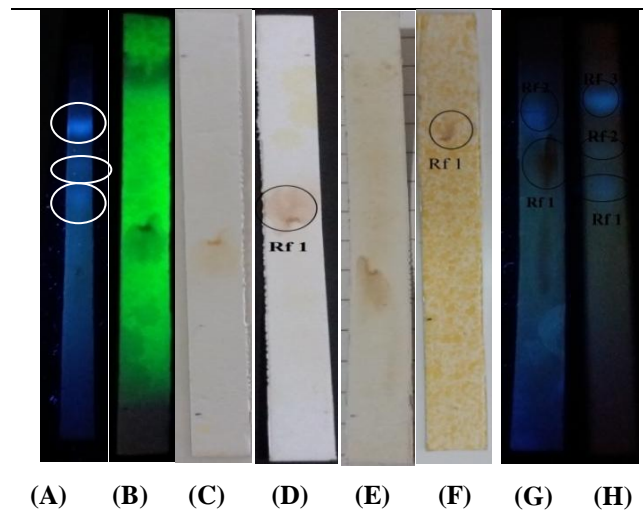
Hasil penelitian yang dilakukan peneliti dengan beberapa penelitian sebelumnya memiliki perbedaan hasil yang signifikan dalam hal nilai IC_{50} nya, sehingga ekstrak tersebut dapat dikatakan poten atau tidak. Hal ini mungkin disebabkan karena perbedaan karakteristik sel kanker yang digunakan dalam penelitian. Menurut Sahidin *et al.* (2011) kulit batang jarak pagar memiliki potensi sebagai agen antikanker K-562 (sel kanker darah) dan H1299 (sel kanker paru). Namun ternyata ekstrak metanol kulit batang jarak pagar kurang poten terhadap sel kanker kolon HT-29 (Oskoueian *et al.*, 2011). Oleh karena itu, karakteristik sel kanker yang berbeda dapat berpengaruh terhadap kepotenan suatu ekstrak dalam melawan sel kanker tertentu.

Salah satu penyebab ketidakpotenan ekstrak etanol biji jarak pagar dimungkinkan karena biji jarak pagar memiliki efek peningkatan kadar mRNA TGF- β 1. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) merupakan sitokin pleiotropik, yang disekresikan oleh berbagai sel termasuk sel imun, sel tumor dan sel stroma. Sinyal TGF- β 1 berperan dalam inisiasi dan perkembangan berbagai jenis kanker sehingga disebut pula sebagai salah satu tumor marker (Han dan Alvarez-Breckenridge, 2015).

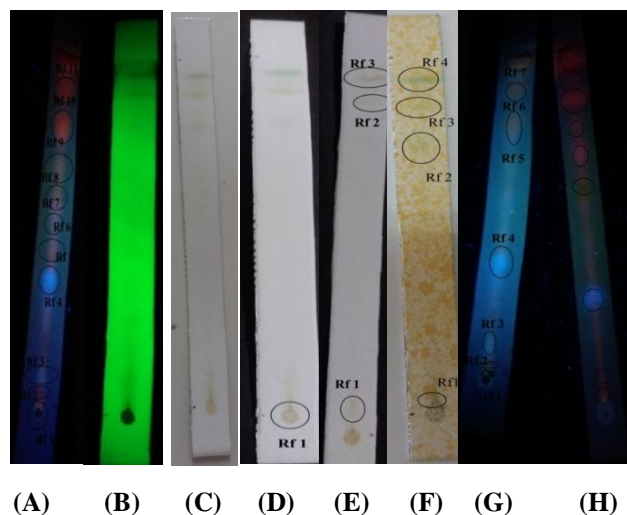
3.3 KLT

Analisis kandungan ekstrak dilakukan menggunakan metode KLT atau kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi planar yang memiliki prinsip berupa perpindahan analit akibat pengaruh pergerakan fase gerak (Gritter *et al.*, 1991).

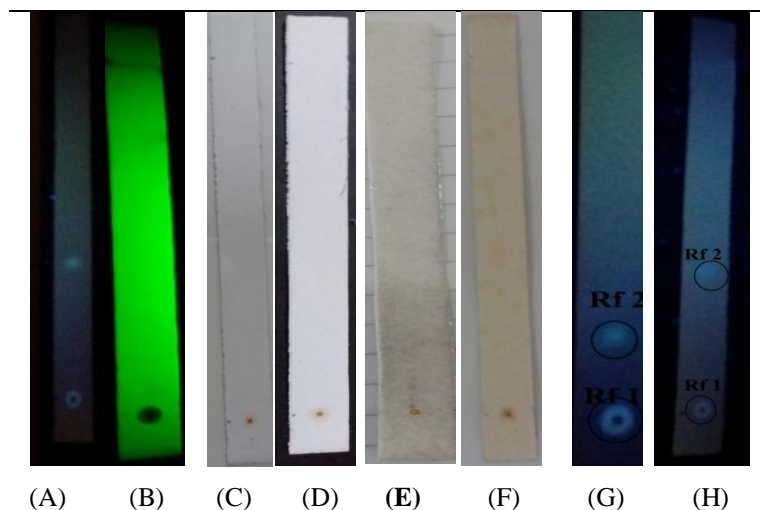
Keuntungan dari penggunaan KLT dalam analisis adalah lebih murah dan mudah digunakan jika dibandingkan dengan kromatografi kolom dan peralatan yang digunakan sederhana (Zaki, 2013). Selain itu, kelebihan kromatografi lapis tipis adalah memiliki pemisahan yang lebih baik jika dibandingkan dengan kromatografi kertas (Pudjaatmaka, 1994). Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk ekstrak etanol akar, kulit batang, dan biji jarak pagar (*Jatropha curcas* Linn) dapat dilihat pada Gambar 4-6 dan Tabel 3.



Gambar 4. Hasil visualisasi KLT ekstrak etanol akar. Fase diam yang digunakan silika GF254, fase gerak yang digunakan n-butanol:asam asetat:air (4:1:5). Dari kiri ke kanan menunjukkan gambar hasil KLT sebelum disemprot di bawah UV 366 nm (A), di bawah UV254 nm (B), dan di bawah sinar tampak (C); setelah perlakuan (semprot) dengan reagen dragendorff di bawah sinar tampak (D), anisaldehyd- H_2SO_4 di bawah sinar tampak (E), FeCl_3 di bawah sinar tampak (F), sitroborat di bawah UV 366 nm (G), dan LB di bawah UV 366 nm (H).



Gambar 5. Hasil visualisasi KLT ekstrak etanol kulit batang. Fase diam yang digunakan silika GF254, fase gerak yang digunakan n-heksana:etil asetat (7:3). Dari kiri ke kanan menunjukkan gambar hasil KLT sebelum disemprot di bawah UV366 nm (A), di bawah UV254 nm (B), dan di bawah sinar tampak (C); setelah perlakuan (semprot) dengan reagen dragendorff di bawah sinar tampak (D), anisaldehyd- H_2SO_4 di bawah sinar tampak (E), FeCl_3 di bawah sinar tampak (F), sitroborat di bawah UV366 nm (G), dan LB di bawah UV366 nm (H).



Gambar 6. Hasil visualisasi KLT ekstrak etanol biji. Fase diam yang digunakan silika GF254, fase gerak yang digunakan n-heksana:metanol (5:5). Dari kiri ke kanan menunjukkan gambar hasil KLT sebelum disemprot di bawah UV 366 nm (A), di bawah UV254 nm (B), dan di bawah sinar tampak (C); setelah perlakuan (semprot) dengan reagen dragendorff di bawah sinar tampak (D), anisaldehyd- H_2SO_4 di bawah sinar tampak (E), FeCl_3 di bawah sinar tampak (F), sitroborat di bawah UV 366 nm (G), dan LB di bawah UV 366 nm (H).

Tabel 3. Hasil analisis kandungan senyawa dalam ekstrak etanol tanaman jarak pagar

NO	Ekstrak	Kandungan Golongan Senyawa
1.	Akar	Alkaloid, fenolik, dan saponin
2.	Kulit Batang	Alkaloid, fenolik, saponin, flavonoid, dan terpenoid.
3.	Biji	saponin

Pada penentuan alkaloid digunakan reagen semprot dragendorff. Hasil positif dragendorff ditunjukkan dengan warna jingga kecoklatan. Berdasarkan hasil percobaan, senyawa alkaloid positif terkandung didalam ekstrak etanol akar dan kulit batang jarak pagar, sedangkan didalam biji tidak terkandung alkaloid. Rf akar dan kulit batang yang mengandung alkaloid secara berurutan adalah 0,54 dan 0,047. Pada penentuan terpenoid digunakan reagen semprot Anisaldehyd- H_2SO_4 . Apabila hasil visualisasi menunjukkan warna merah-ungu di bawah sinar tampak atau UV366 nm, maka ekstrak tersebut positif mengandung terpenoid (Wagner and Bladt, 1996). Ekstrak yang positif mengandung senyawa terpenoid adalah kulit batang jarak pagar dengan nilai Rf 0,013 dan 0,828. Reagen semprot FeCl_3 digunakan untuk memvisualisasi kandungan senyawa fenolik dalam suatu ekstrak tanaman. Hasil positif fenolik ditunjukkan dengan warna abu-abu sampai biru di bawah sinar tampak (Wagner and Bladt, 1996). Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan hasil akar dan kulit batang jarak pagar positif mengandung fenolik. Nilai Rf masing-masing dari akar dan kulit

batang jarak pagar secara berurutan adalah 0,91 dan 0,750. Kandungan senyawa flavonoid dapat divisualisasi dengan reagen semprot sitroborat. Ekstrak yang positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning kehijauan di bawah sinar UV366 nm (Markham, 1988). Dari ketiga ekstrak yang dianalisis, ekstrak yang mengandung flavonoid adalah ekstrak etanol kulit batang jarak pagar dengan nilai Rf adalah 0,30. Analisis kandungan senyawa saponin dapat dilakukan menggunakan reagen semprot Liebermann-Burchard (LB). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau pada UV366 nm (Handayani *et al.*, 2008). Hasil analisis terhadap ketiga ekstrak menunjukkan hasil bahwa akar, kulit batang, dan biji jarak pagar mengandung saponin. Nilai Rf akar, kulit batang, dan biji jarak pagar secara berurutan adalah 0,68; 0,672; dan 0,038.

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan mengenai kandungan senhyawa dalam akar dan lateks jarak pagar mengandung fenolik, flavonoid, dan saponin yang menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan, antikanker, dan antiinflamasi (Oskoueian *et al.*, 2011). Kulit batang jarak pagar mengandung fenolik, asam fitat, inhibitor tripsin, lektin, saponin, dan forbol ester (Oskoueian *et al.*, 2011). Biji jarak pagar mengandung forbol ester yang menunjukkan aktivitas sebagai agen antikanker (Oskoueian *et al.*, 2011). Biji jarak pagar mempunyai kandungan minyak, protein, serat, air, abu, dan karbohidrat (Nurcholis M, 2007).

Terdapat beberapa perbedaan kandungan analisis yang dilakukan peneliti dengan beberapa penelitian sebelumnya. Kandungan analisis dari suatu tanaman dapat berbeda dikarenakan asal pengambilan tanaman berbeda (dipengaruhi oleh tanah, iklim, pengairan). Tanaman yang digunakan oleh peneliti berasal dari Desa Juron Kecamatan Nguter, Sukoharjo. Akar dan biji jarak pagar dalam jurnal yang dijadikan acuan berasal dari Malaysia, sedangkan kulit batang jarak pagar berasal dari Sulawesi.

4. PENUTUP

Berdasarkan pembahasan diatas, kesimpulan yang diperoleh adalah ekstrak etanol akar jarak pagar termasuk kategori lemah sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara T47D. Ekstrak etanol kulit batang dan biji jarak pagar tidak toksik sebagai antikanker. Senyawa yang terkandung dalam akar adalah alkaloid, saponin, fenolik dan flavonoid. Senyawa yang terkandung dalam kulit batang jarak pagar adalah alkaloid, saponin, terpenoid, fenolik, dan flavonoid. Senyawa yang terkandung dalam biji adalah saponin.

PERSANTUNAN

Terimakasih kepada seluruh Dosen dan staff Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta yang telah membantu hingga dapat terselesaikannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdat M.S., 2015, Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Antosianin dalam Umbi Ubi Jalar Ungu (*Ipomea batatas*), *Skripsi*, Universitas Lampung, Lampung.
- Akbar E., Yaakob Z., Kamarudin S.K., Ismail M., Salimon J., 2009, Characteristic and Composition of *Jatropha curcas* Oil Seed from Malaysia and Its Potential as Biodiesel Feedstock. *European Journal of Scientific Research*, 29 (3), 396-403.
- American Cancer Society, 2016, *Cancer Facts and Figures*, American Cancer Society, Atlanta.
- Ardiyansyah, Sahidin I., Taher M., 2009, Profile of Cucusone B from Stembark of *Jatropha curcas* as An Antimicrobial and Anticancer Agent, *Paper Presented at The Malaysian National Product International Seminar (MNPIS) 2009*, Kuantan Pahang.
- Aula S., Lakkireddy S., Jamil K., Kapley A., Swamy A.V.N., Lakkireddy H.R., 2015, Biophysical, Biopharmaceutical and Toxicological Significance of Biomedical Nanoparticles: Review Article, *Royal Society of Chemistry*, 5, 47830-47859
- Basset J., Denny R.C., Jeffrey G.H., Mendham J., (Terjemahan: Pudjaatmaka, A.H), (1994), *Buku ajar Vogel: Kimia analisis kuantitatif anorganik, Edisi keempat*, Penerbit: Buku Kedokteran, EGC, Jakarta.
- CCRC, 2009, *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*, Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC), Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Depkes dan Kesejahteraan Sosial, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan dan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta.
- Depkes, 2010, *Laporan PTM Berdasarkan Rumah Sakit dan Puskesmas Kabupaten Sukoharjo*, Depkes, Sukoharjo.
- Frank L.M., and Teich N.M., 1997, *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3th ed., Oxford University Press, London.
- Goel G., Makkar H.P.S., Francis G., Becker K., 2007, Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals, *Int. J. Toxicol*, 26, 279–288.
- Goldin A., Venditti J.M., Macdonald J.S., Muggia F.M., Henney J.E., Devita V.T.Jr., 1965, Current Results of the Screening Program at the Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. *Eur J Cancer*, 17, 129-42.
- Gritter R.J., Bobbit J.M., and Schwarting A.E., 1991, *Pengantar Kromatografi*, Diterjemahkan oleh Padmawinata K., Penerbit ITB, Bandung.
- Han J., and Alvarez-Breckenridge C.A., 2015. TGF- β 1 Signaling and Its Targeting for Glioma Treatment. *Am J Cancer Res*. 5 (3), 945-955.
- Handayani D., Sayuti N., dan Dachriyanus, 2008, Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksi Stera dari Spon Laut *Petriosia nigrans* Asal Sumatra Barat, *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II*, Universitas Lampung, Lampung.
- Harborne J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, ed 2, Penerbit ITB, Bandung.
- Li X., Lu Y., Liang K., Liu B. & Fan Z., 2005, Differential Responses to Doxorubicin-Induced Phosphorylation and Activation of Akt in Human Breast Cancer Cells, *Breast Cancer Research*, 7, 589-597.

- Jayanudin., Lestari A.Z., Nurbayanti F., 2014, Pengaruh Suhu dan Rasio Pelarut Ekstraksi terhadap Rendemen dan Viskositas Natrium Alginat dari Rumput Laut Cokelat (*Sargassum* sp), *Jurnal Integrasi Proses*, 5 (1): 51-55.
- Kemenkes RI, 2015, *InfoDATIN Stop Kanker*, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Kemenkes RI, 2017, *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara*, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Markham K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Diterjemahkan oleh Padmawinata, K., Penerbit ITB, Bandung, p. 47.
- Meister K. and Morgan J., 2000, *Risk Factor for Breast Cancer*, American Council on Science and Health, New York.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. 2004. Anthracyclins: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol Rev*, 56, 185-228.
- Nafrialdi and Gunawan S.G., 2007, *Antikanker, Farmakologi dan Terapi Edisi ke 5*, Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Nurcholis M, 2007, *Jarak Pagar dan Pembuatan Biodiesel*, Seri Budi Daya, Yogyakarta
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., and Willard H.F., 2001, *Thompson and Thompson Genetics and Medicine*, 6th ed., WB Saunders Company, Philadelphia.
- Oskoueian H., Abdullah N., Saad W., Omar A.R., Ahmad S., Wen B.K., Zolkifli N.A., Hendra R., Yin W.H., 2011, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Methanolic Extracts from *Jatropha curcas* Linn, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (1), 49-57.
- Oskoueian H., Abdullah N., Saad W., Omar A.R., Ahmad S., Wen B.K., Zolkifli N.A., Hendra R., Yin W.H., 2011, Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* Linn Kernel Meal Extract, *Journal of Molecule Science*, 12, 5955-5970.
- Oskoueian H., Abdullah N., Ahmad S., 2012, Phorbol Esters from *Jatropha* Meal Triggered Apoptosis, Activated PKC- δ , Caspase-3 Proteins and Down Regulated the Proto-Oncogenes in MCF-7 and HeLa Cancer Cell Lines, *Journal Of Molecule Science*, 17, 10816-10830.
- Pane M, 2002, Aspek Klinis dan Epidemiologi Penyakit Kanker Payudara, *Majalah Medika*, 8, XVIII.
- Prasad D.M.R., Izam A., Khan M.R., 2012, *Jatropha curcas*: Plant of Medical Benefits, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (14), 2691-2699.
- Price S.A. and Wilson L.M., 2006, *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*, EGC, Jakarta.
- Purwanto A., Fajriyati A.N., Wahyuningtyas D., 2014, Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan dalam Ekstrak Minyak Bekatul Padi, *Ekulilibrium*, 13 (1), 29-34.
- Renault J.H., Nuzillard J.M., Crouerour G.L., Thepenier P., 1999, Isolation of Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus* by Centrifugal Partition Chromatography in the pH-Zone Refining Mode, *J Chromatography A*, 849, 421-431.
- Robson M. and Offit K., 2007, Management of Inherited Predisposition to Breast Cancer, *N Engl J Med*, 357, 154-162.
- Sahidin, Ardiansyah, Taher M., Marianti M., 2011, Terpenoids from the Stem Bark of *Jatropha Curcas* Plants and Their Biological Activities, *Makara Sains*, 15 (2), 106-110.

- Sahidin., Nakazibwe S., Taher M., Saxena A.K., Ichwan S.J.A., Ardiyansyah., 2011., Antiproliferative Activity of Curcusone B from *Jatrophacurcas* on Human Cancer Cell Lines, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (8), 47-51.
- Saifudin A., 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder:Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*, Deepublish, Yogyakarta.
- Sarker S.D., Zahid L., dan Alexander I.G., 2006. *Natural Products Isolation*, Humana Press, New Jersey.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A., 2017, Cancer Statistik, *CA Cancer J Clin*, 67, 7-30.
- Smith L., Watson M.B., O’Kane S.L., Drew P.J., & Lind M.J., 2006, The Analysis of Doxorubicin Resistance in Human Breast Cancer Cell Using Antibody Microarray, *Molecular Cancer Therapy*, 5 (8), 2115-2120.
- Sukardja I.D.G., 2000, *Onkologi Klinik*, Ed 2, Airlangga University Press, Surabaya.
- Susidarti R.A., Jenie R.I., Ikawati M., Putri D.D.P., Meiyanto E., 2014, Cytotoxic Activity and Apoptosis Induction of 8-Hydroxysocapnolactone-2’,3’-diol and Its Combination with Doxorubicin on MCF-7 and T47D Cells, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (6), pp, 089-097.
- Thomas R., Sah N., Sharma P., 2008, Therapeutic Biology of *Jatropha curcas*: A Mini Review, *Curr Pharm Biotechnol*, 9 (4), 315-324.
- Tjay T.H., and Rahardja K., 2002, *Obat-Obat Penting: Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya*, Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Underwood J.C.E., 1999, *General and Systematic Pathology*, Ed 2, EGC, Jakarta.
- Wijayakusuma H.M.H., Dalihmarta S, Winar A.S., 1992, *Tanaman Berkasiat Obat di Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Pustaka Kartini Ikapi Jaya
- Zaki M.W., 2013, Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak n-Heksana Lumut Hati *Mastigophora diclados* (Brid. Ex Web) Nees, *Skripsi*, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, Jakarta.